

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.  
Vol. 17, 1979, pp. 1-7

## Peroxidase aus Meerrettich: Kinetische Studien sowie Optimierung der Aktivitätsbestimmung mit den Substraten $\text{H}_2\text{O}_2$ und 2,2'-Azino-di-(3-ethyl-benzthiazolinsulfonsäure-(6)) (ABTS)

Von H. Gallati

Diagnostische Forschungsabteilung der F. Hoffmann-La Roche & Co. AG Basel (Schweiz)

(Eingegangen am 19. Juni / 5. August 1978)

**Zusammenfassung:** Die kinetischen Studien der Peroxidase aus Meerrettich konzentrieren sich vor allem auf die Abhängigkeit der Enzymaktivität von der  $\text{H}_2\text{O}_2$ - und der ABTS-Konzentration bei verschiedenen pH-Werten. Dabei werden die *Michaelis*-Konstanten für die beiden Substrate bestimmt und in Korrelation zum pH gesetzt. Die Resultate zeigen, daß die Affinität von ABTS zur Peroxidase mit steigendem pH-Wert abnimmt, die pH-Optima mit höheren ABTS-Konzentrationen gegen den Neutralpunkt verschoben werden, und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit beim pH 4,2 mit einer ABTS-Konzentration von 2 mmol/l erreicht wird.

Aus den kinetischen Daten des  $\text{H}_2\text{O}_2$  wird deutlich, daß das dissoziierte  $\text{O}_2\text{H}^-$  als eigentlicher Wasserstoff-Akzeptor bei der Peroxidase-Reaktion angesehen werden muß. Bei der Komplexbildung mit der Peroxidase konkurrieren ABTS und  $\text{H}_2\text{O}_2$ , wodurch die *Michaelis*-Konstanten der beiden Substrate gegenseitig beeinflusst werden.

Zur Optimierung der Aktivitätsbestimmung der Peroxidase werden die Einflüsse der Puffersysteme, des pH-Wertes, der Konzentrationen von ABTS und  $\text{H}_2\text{O}_2$  sowie der Reaktionsdauer auf die Aktivität der Peroxidase untersucht und auf Grund dieser Ergebnisse ein Testverfahren vorgeschlagen, das erlaubt, die Peroxidase bis zu einer Konzentration von 10 ng/l zu bestimmen.

*Horseradish peroxidase: A study of the kinetics and the determination of optimal reaction conditions, using hydrogen peroxide and 2,2'-azinobis 3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) as substrates*

**Summary:** The reaction of the two substrates hydrogen peroxide and ABTS with horseradish peroxidase was studied kinetically. Enzyme activity was determined as a function of substrate concentration and pH. *Michaelis* constants were determined for the two substrates at various pH values. It was found that the affinity of the enzyme for ABTS decreases with increasing pH, and that with higher ABTS concentrations the pH optima of the reaction are shifted towards neutrality. Maximal rate is reached at pH 4.2 with an ABTS concentration of 2 mmol/l.

For hydrogen peroxide the data show that the dissociated  $\text{O}_2\text{H}^-$  is the proper substrate, its affinity for the enzyme being independent of pH. The two substrates show competitive binding to the peroxidase, and each therefore influences the binding constant of the other.

A procedure is proposed which allows the determination of peroxidase down to a concentration of 10 ng/l or  $2.5 \times 10^{-13}$  mol/l.

### Einleitung

Die Peroxidase aus Meerrettich (Donor: hydrogen peroxide oxidoreductase, EC 1.11.1.7) wird häufig bei den enzym-immunologischen Bestimmungen als Markierungs- und Indikatorenzym verwendet. Daher ist eine einfache Methode zur quantitativen Erfassung kleinster Peroxidase-mengen von entscheidender Bedeutung.

In der vorliegenden Arbeit werden die katalytischen Eigenschaften der Peroxidase aus Meerrettich untersucht, um Einblick in den Wirkungsmechanismus dieses

Enzyms zu erhalten. Diese Untersuchungen betreffen vor allem die Abhängigkeit der Peroxidaseaktivität von der Konzentration der beiden Substrate  $\text{H}_2\text{O}_2$  als Wasserstoff-Akzeptor und des Redoxindikators 2,2'-Azino-di-(3-ethyl-benzthiazolinsulfonat-(6)) (ABTS) als Wasserstoff-Donator bei verschiedenen pH-Werten. Zudem werden die Reaktionsbedingungen für die Aktivitätsbestimmung der Peroxidase optimiert.

ABTS ist eines der von S. Hünig (1-3) synthetisierten und polarographisch untersuchten heterocyclischen Azine,

die als Redoxsysteme drei Oxidationsstufen aufweisen: In einem ersten Schritt wird das meist farblose Azin zu einem stabilen, stark gefärbten Radikalkation oxidiert und bei einem weiteren Elektronenentzug zum Azodikation überführt. Beim ABTS erfolgt der zweite Oxidationsschritt vom grünen Radikalkation zum roten Dikation nur bei großem Überschuß an Oxidationsmittel und in stark saurem Reaktionsmilieu.

Da ABTS relativ einfach herzustellen ist und wegen der Sulfonierung eine gute Wasserlöslichkeit aufweist, eignet es sich gut als Redoxindikator für die Cerimetrie (4) wie auch als Chromophor für die photometrische  $H_2O_2$ -Bestimmung bei Anwesenheit von Peroxidase (5-12).

Die Peroxidase ist eines der meist untersuchten Enzyme (Übersichtsartikel: l. c. (14)), dessen Proteinstruktur in der Zwischenzeit aufgeklärt werden konnte (15). Trotzdem bestehen noch immer offene Fragen bezüglich des Reaktionsmechanismus und der kinetischen Eigenschaften. Für R. Childs (16), der den Reaktionsmechanismus der Peroxidase mit dem Redoxindikator ABTS untersuchte, bleibt die Wirkungsweise dieses Enzyms weiterhin komplex und ungeklärt. J. Shindler, der mit  $H_2O_2$  und ABTS die Kinetik der Lactoperoxidase (17) sowie die Kinetik der Peroxidase aus menschlichem Cervicalschleim (18) untersuchte, konnte weder für  $H_2O_2$  noch für ABTS die Michaelis-Konstanten bestimmen.

## Material und Methoden

Die Peroxidase aus Meerrettich (Donor: hydrogen peroxide oxidoreductase, EC 1.11.1.7) wurde in lyophilisierter Form von Boehringer, Mannheim bezogen. Die Reinheitszahl wurde mit „ca. 3,0“ angegeben.

ABTS (kristallisiertes Diammoniumsalz der 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolinsulfonsäure-(6)) wurde von Sigma und von Boehringer, Mannheim bezogen. Beide Produkte wurden ohne weitere Reinigung eingesetzt, obwohl ca. 1-3% der Substanz zum grünen ABTS-Radikalkation oxidiert war.

$H_2O_2$  wurde in einer 300 g/kg Lösung von der Firma Lehner AG, Muttens, Schweiz geliefert.

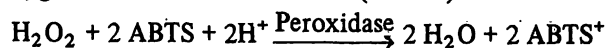
Die übrigen Chemikalien waren von analytischer Reinheit.

Zur Bestimmung der Peroxidaseaktivität werden in einer Meßzelle von 10 mm Schichtdicke zu 2,0 ml Peroxidase-Testlösung (0,1 mol/l Natriumacetat, 0,05 mol/l Natriumdihydrogenphosphat, 2,0 mmol/l ABTS und 2,5 mmol/l  $H_2O_2$  vom pH 4,2) 0,05 ml Peroxidaselösung (Peroxidase-Konzentration in der Testlösung: 10 bis 500 ng/l) zugemischt und bei 25 °C die Absorptionszunahme während 10 bis 60 Minuten photometrisch bei der Wellenlänge 414 nm gemessen. Abweichungen von diesem Testvorgehen – besonders bezüglich der Zusammensetzung der Testlösung – werden bei den einzelnen Versuchen speziell erwähnt.

## Resultate und Diskussion

### Spektren des reduzierten ABTS sowie des ABTS-Radikalkations

1 mol  $H_2O_2$  oxidiert unter der katalytischen Einwirkung von Peroxidase 2 mol reduziertes ABTS (ABTS) zum stabilen, grünen ABTS-Radikalkation ( $ABTS^+$ ).



Das Spektrum dieses ABTS-Radikalkations ist in Abbildung 1 aufgezeichnet. Es zeigt, daß die grüne Farbe aus einer Mischung von Gelb und Blau entsteht. Das Absorptionsmaximum liegt bei 414 nm. Demgegenüber ist die Absorption bei 405 nm um 7%, bei 578 nm um 75% und bei 650 nm um 63% geringer, was sich entsprechend auf die Sensitivität der Aktivitätsbestimmung der Peroxidase auswirkt. Für die weiteren Versuche wurde die Farbinintensität des ABTS-Radikalkations bei der Wellenlänge 414 nm gemessen.

Das reduzierte ABTS ist farblos, sein Absorptionsmaximum liegt bei der Wellenlänge 340 nm.

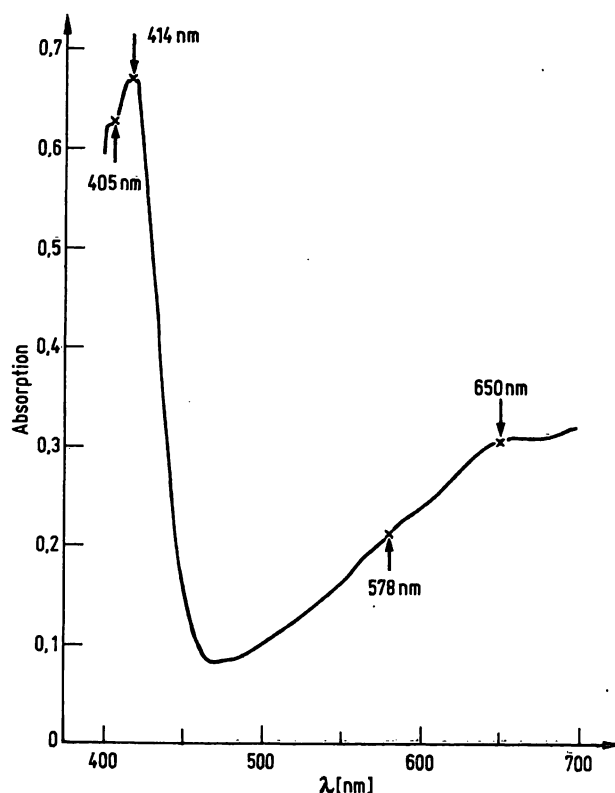


Abb. 1. Absorptionsspektrum des ABTS-Radikalkations ( $ABTS^+$ ). Nach der katalytischen Einwirkung von 200 ng/l Peroxidase auf 2 mmol/l ABTS und 2,5 mmol/l  $H_2O_2$  in 0,1 mol/l Natriumacetat mit 0,05 mol/l Natriumdihydrogenphosphat während 60 Minuten bei 25 °C wird das Spektrum des gebildeten ABTS-Radikalkations gegen den Reagenzienleerwert im Wellenlängenbereich von 400–700 nm aufgenommen.

### Peroxidaseaktivität in Abhängigkeit zur ABTS-Konzentration bei verschiedenen pH-Werten

Um einen genaueren Einblick in die Besonderheiten der Peroxidase aus Meerrettich zu erhalten, wurde zunächst bei gegebener  $H_2O_2$ -Konzentration von 2,5 mmol/l die Wirkung der ABTS-Konzentration bei unterschiedlichen pH-Werten auf die Peroxidaseaktivität untersucht. Die dabei erhaltenen Resultate sind in den Abbildungen 2 und 3 zusammengefaßt. Daraus ist ersichtlich, daß sowohl die maximal mögliche Reaktionsgeschwindigkeit der Peroxidase wie auch die dafür notwendige optimale ABTS-

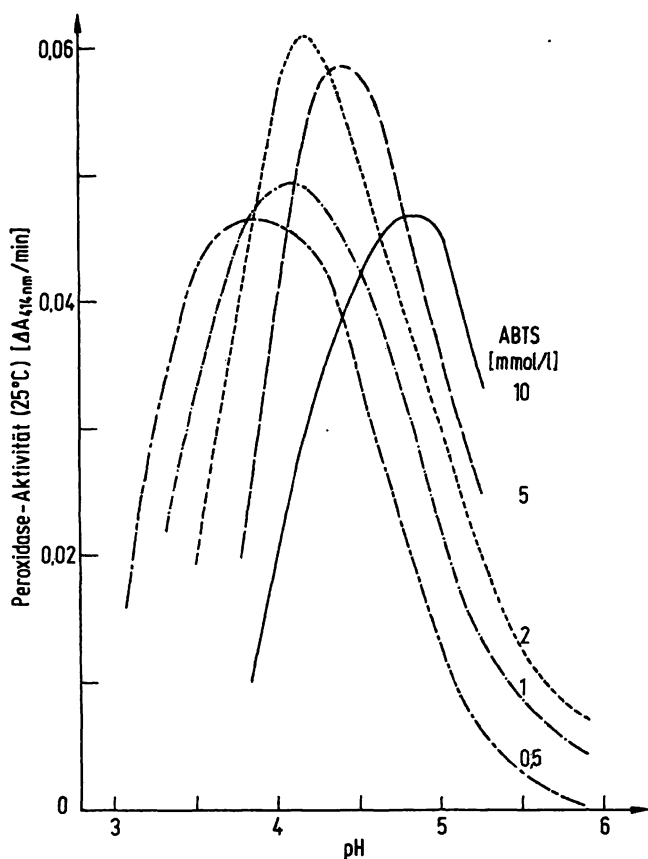


Abb. 2. pH-Aktivitätskurve der Peroxidase in Abhängigkeit zur ABTS-Konzentration.

Aktivitätsbestimmung von 0,5 µg/l Peroxidase in 0,1 mol/l Natriumacetat, 0,05 mol/l Natriumdihydrogenphosphat, 2,5 mmol/l  $H_2O_2$  und den entsprechenden ABTS-Konzentrationen bei den angegebenen pH-Werten. Reaktionstemperatur: 25 °C.

Konzentration vom pH-Wert abhängig ist. Bei geringeren pH-Werten genügen nach dem Kurvenverlauf der Abbildung 2 geringere ABTS-Konzentrationen zur Sättigung des vorhandenen Enzyms und zur Erreichung der bei diesen pH-Werten maximal möglichen Reaktionsgeschwindigkeit. Mit steigendem pH-Wert ist eine größere ABTS-Menge zur vollen Enzymsättigung notwendig. Dies besagt, daß die ABTS-Affinität der Peroxidase mit steigendem pH-Wert abnimmt. Die höchste Peroxidaseaktivität wird unter den angegebenen Reaktionsbedingungen beim pH 4,2 mit einer ABTS-Konzentration von 2 mmol/l erreicht. Die einzelnen pH-Optima der Enzymaktivität werden mit zunehmender ABTS-Konzentration gegen den Neutralpunkt verschoben.

In Abbildung 3 ist die Abhängigkeit der Peroxidaseaktivität von der ABTS-Konzentration bei den verschiedenen pH-Werten nach der Darstellungsweise von *Lineweaver-Burk* zusammengefaßt. Daraus kann direkt die ABTS-Affinität der Peroxidase als  $K_m$  wie auch die maximal mögliche Reaktionsgeschwindigkeit bei den betreffenden pH-Werten abgelesen werden.

Die Abbildung 4 zeigt die Korrelation der ABTS-Affinität ( $pK_m = -\log K_m$ ) der Peroxidase zu den entsprechen-

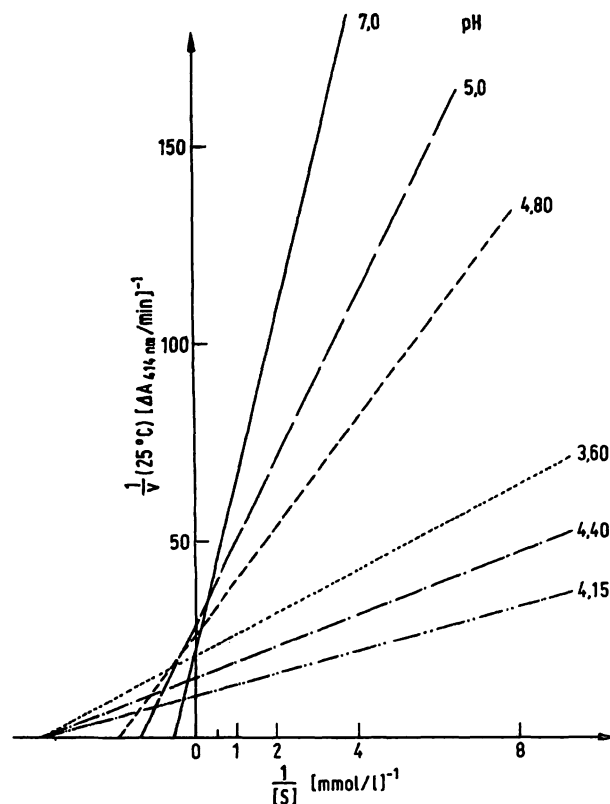


Abb. 3. Michaelis-Konstante der Peroxidase für ABTS bei verschiedenen pH-Werten.

Aktivitätsbestimmung von 0,5 µg/l Peroxidase in 0,1 mol/l Natriumacetat, 0,05 mol/l Natriumdihydrogenphosphat, 2,5 mmol/l  $H_2O_2$  und den entsprechenden ABTS-Konzentrationen bei den angegebenen pH-Werten. Reaktionstemperatur: 25 °C. Darstellung nach *Lineweaver-Burk*.

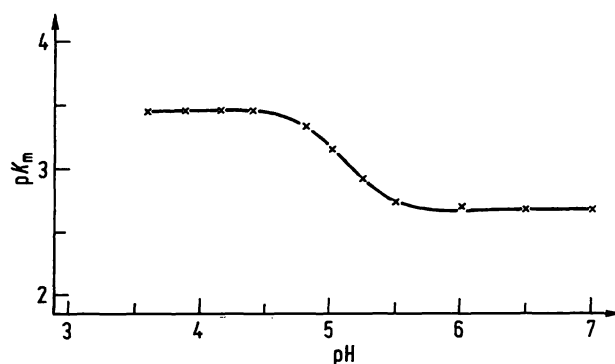


Abb. 4. Abhängigkeit der  $pK_m$ -Werte vom pH für ABTS.

Die aus der Abbildung 3 errechneten Michaelis Konstanten  $K_m$  werden als  $pK_m (= -\log K_m)$  in Abhängigkeit zum pH dargestellt.

den pH-Werten. Dieser Kurvenverlauf bedeutet nach *M. Dixon* (19), daß durch die ABTS-Peroxidase-Komplexbildung die Ionisierung der für die Enzymaktivität entscheidenden Gruppe der Peroxidase zunimmt.

#### Peroxidaseaktivität in Abhängigkeit zur $H_2O_2$ -Konzentration bei verschiedenen pH-Werten

Bei Anwesenheit von 2 mmol/l ABTS wurde die Abhängigkeit der Peroxidaseaktivität von der  $H_2O_2$ -Konzen-

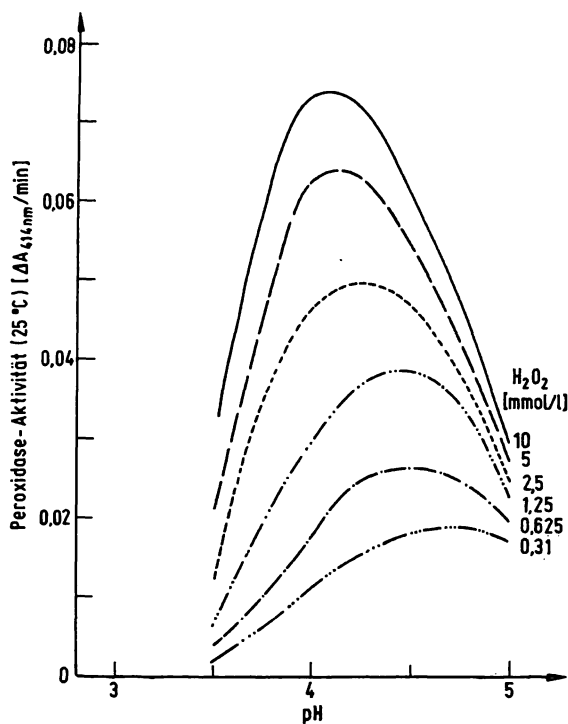


Abb. 5. pH-Aktivitätskurve der Peroxidase in Abhängigkeit zur  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration.

Aktivitätsbestimmung von  $0,5 \mu\text{g/l}$  Peroxidase in  $0,1 \text{ mol/l}$  Natriumacetat,  $0,05 \text{ mol/l}$  Natriumdihydrogenphosphat,  $2 \text{ mmol/l}$  ABTS und den entsprechenden  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen bei den angegebenen pH-Werten. Reaktionstemperatur:  $25^\circ\text{C}$ .

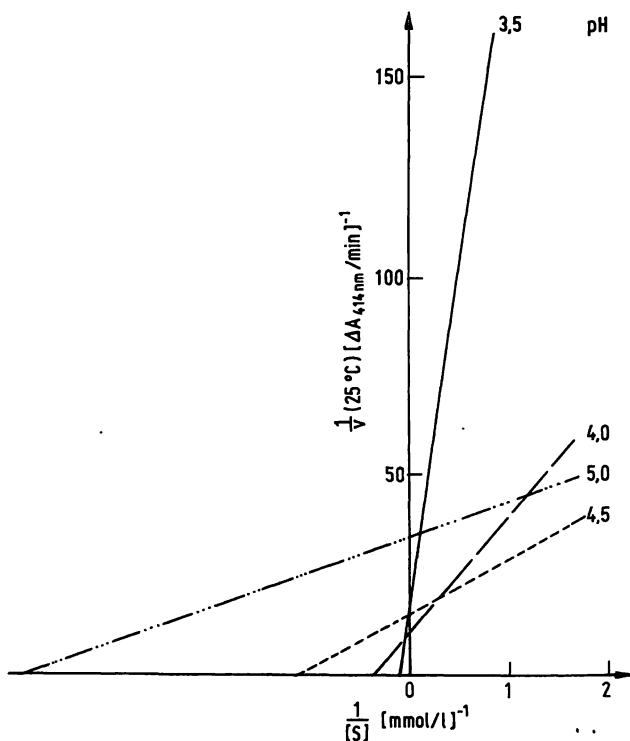


Abb. 6. Michaelis Konstante der Peroxidase für  $\text{H}_2\text{O}_2$  bei verschiedenen pH-Werten.

Aktivitätsbestimmung von  $0,5 \mu\text{g/l}$  Peroxidase in  $0,1 \text{ mol/l}$  Natriumacetat,  $0,05 \text{ mol/l}$  Natriumdihydrogenphosphat,  $2 \text{ mmol/l}$  ABTS und den entsprechenden  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen bei den angegebenen pH-Werten. Reaktionstemperatur:  $25^\circ\text{C}$ . Darstellung nach Lineweaver-Burk.

tration und dem pH-Wert untersucht. Die entsprechenden Resultate sind in den Abbildungen 5 und 6 zusammengefaßt.

Die Abbildung 5 zeigt eine deutliche Verschiebung der pH-Optima der Peroxidaseaktivität bei abnehmender  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration gegen den Neutralpunkt hin. Im Gegensatz zum ABTS nimmt die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Affinität der Peroxidase mit steigendem pH-Wert wesentlich zu, was vor allem deutlich wird, wenn diese Resultate nach der Darstellungsweise von Lineweaver-Burk wiedergegeben werden (Abb. 6). Im untersuchten pH-Bereich nimmt die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Affinität zur Peroxidase pro pH-Einheit um das zehnfache zu, wie dies aus der  $\text{pK}_m$  : pH-Korrelation ersichtlich wird (Abb. 7). Dieser  $\text{pK}_m$  - pH-Kurvenverlauf kann auf folgende Weise interpretiert werden: In ähnlicher Weise wie Wasser dissoziiert auch das  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu  $\text{H}^+$  und  $\text{O}_2\text{H}^-$ . Bei einer vorgegebenen  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration nimmt dementsprechend mit steigendem pH-Wert die  $\text{O}_2\text{H}^-$ -Konzentration gleichsinnig zu. Da nun aber anzunehmen ist, daß das  $\text{O}_2\text{H}^-$  als das eigentliche Substrat der Peroxidase zu betrachten ist, muß zur Aufrechterhaltung einer gleichbleibenden  $\text{O}_2\text{H}^-$ -Konzentration in der Testlösung bei tieferen pH-Werten eine entsprechend höhere  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration eingesetzt werden. Die Erhöhung der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Affinität der Peroxidase mit steigendem pH-Wert ist demnach nur eine scheinbare, die eigentliche Substrataffinität ( $\text{O}_2\text{H}^-$ ) der Peroxidase wird innerhalb des untersuchten pH-Bereichs vom pH nicht beeinflusst.

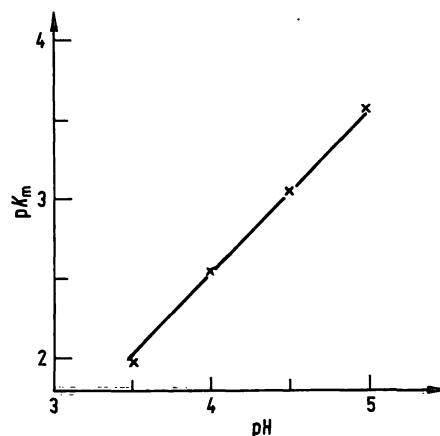


Abb. 7. Abhängigkeit der  $\text{pK}_m$ -Werte für  $\text{H}_2\text{O}_2$  vom pH.

Die aus der Abbildung 6 errechneten Michaeliskonstanten  $K_m$  werden als  $\text{pK}_m (= -\log K_m)$  in Abhängigkeit zum pH aufgetragen.

#### Gegenseitige Beeinflussung von ABTS und $\text{H}_2\text{O}_2$ bezüglich der Peroxidase-Affinität

Für die katalytische Reaktion müssen sowohl ABTS wie auch  $\text{H}_2\text{O}_2$  von der Peroxidase komplex gebunden werden. Um die gegenseitige Beeinflussung dieser beiden Substrate bei der Komplexbildung mit dem Enzym zu untersuchen, wurde die Peroxidaseaktivität bei sonst

identischen Reaktionsbedingungen mit unterschiedlichen ABTS- und  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen bestimmt. Die dabei erhaltenen Resultate, die in der Tabelle 1 zusammengefaßt sind, zeigen deutlich, daß ABTS und  $\text{H}_2\text{O}_2$  bei der Komplexbildung mit der vorhandenen Peroxidase stark konkurrieren. Die Erhöhung der Konzentration des einen Substrates (ABTS oder  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) senkt die Affinität des anderen Substrates und erschwert dementsprechend die Komplexbildung mit der Peroxidase. Die Michaelis-Konstante  $K_m$  des einen Substrates wird größer, je mehr vom anderen Substrat in der Testlösung enthalten ist. Dabei ist allerdings zu betonen, daß die katalytische Reaktionsgeschwindigkeit nicht direkt abhängig ist von der Substrataffinität. Die größtmögliche Peroxidaseaktivität wird bei einem optimalen Konzentrationsverhältnis der beiden Substrate ABTS und  $\text{H}_2\text{O}_2$  erreicht.

Tab. 1. Michaelis-Konstanten für ABTS und  $\text{H}_2\text{O}_2$  in gegenseitiger Abhängigkeit

In 0,1 mol/l Natriumacetat und 0,05 mol/l Natriumdihydrogenphosphat vom pH 4,2 wird die Aktivität von 0,5  $\mu\text{g/l}$  Peroxidase in Anwesenheit unterschiedlicher ABTS- und  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen bei einer Reaktionstemperatur von 25 °C photometrisch gemessen und die entsprechenden Michaelis-Konstanten für ABTS und  $\text{H}_2\text{O}_2$  bestimmt.

$\text{H}_2\text{O}_2$ (mmol/l)	$K_m$ für ABTS (mmol/l)	$K_m$ für $\text{H}_2\text{O}_2$ (mmol/l)	ABTS (mmol/l)
10,0	0,66	1,56	2,0
5,0	0,50	1,0	1,0
2,5	0,24	0,30	0,5
1,25	0,15	0,158	0,25

#### *Einfluß des Puffersystems auf die Aktivität der Peroxidase*

Als günstigstes Puffersystem erweist sich 0,1 mol/l Natriumacetat, dem zur Stabilisierung des Reagenzienleerwertes 0,05 mol/l Natriumdihydrogenphosphat zugesetzt werden. Demgegenüber ist unter sonst identischen Reaktionsbedingungen (2 mmol/l ABTS, 2,5 mmol/l  $\text{H}_2\text{O}_2$ , pH 4,2 und 25 °C) die Peroxidaseaktivität zu Beginn der katalytischen Reaktion in 0,1 mol/l Natriumcitrat um 11%, in 0,1 mol/l L-Tartrat um 25% und in 0,1 mol/l Natriumphthalat um 44% geringer. Zudem nimmt in dieser gleichen Reihenfolge die Peroxidase-Inaktivierung während der Reaktionsdauer zu, so daß die Aktivitätsunterschiede immer größer werden, je länger die Peroxidase in den entsprechenden Testlösungen inkubiert wird. Die Konzentration an Natriumacetat hat im Bereich von 50 bis 200 mmol/l bei Anwesenheit von 50 mmol/l Natriumdihydrogenphosphat keinen Einfluß weder auf die Aktivität noch auf die Inaktivierungsgeschwindigkeit der Peroxidase.

Ammoniumionen, welche die Aktivität der Meerrettich-Peroxidase um das 160-fache aktivieren, wenn sie bei hö-

heren pH-Werten mit den Substraten  $\text{H}_2\text{O}_2$  und *o*-Dianisidin bestimmt wird (20), haben bei pH 4,2 bei Anwesenheit der Substrate  $\text{H}_2\text{O}_2$  und ABTS keinen Einfluß auf die Reaktionsgeschwindigkeit der Peroxidase.

#### *Einfluß der Reaktionsdauer auf die Aktivität der Peroxidase*

Da bei den enzym-immunologischen Tests kleinste Mengen Peroxidase nachgewiesen und daher das Enzym längere Zeit in der Testlösung inkubiert werden muß, ist es notwendig, die Peroxidaseaktivität auch in Abhängigkeit zur Reaktionsdauer zu untersuchen. Aus den diesbezüglichen Resultaten, die in der Abbildung 8 zusammenge stellt sind, wird deutlich, daß für die Optimierung der Reaktionsbedingungen bei der Peroxidase auch der Zeitfaktor miteinbezogen werden muß. Je nach Reaktionsdauer ändert sich die optimale  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration. So wird bei Anwesenheit von 2 mmol/l ABTS die höchste

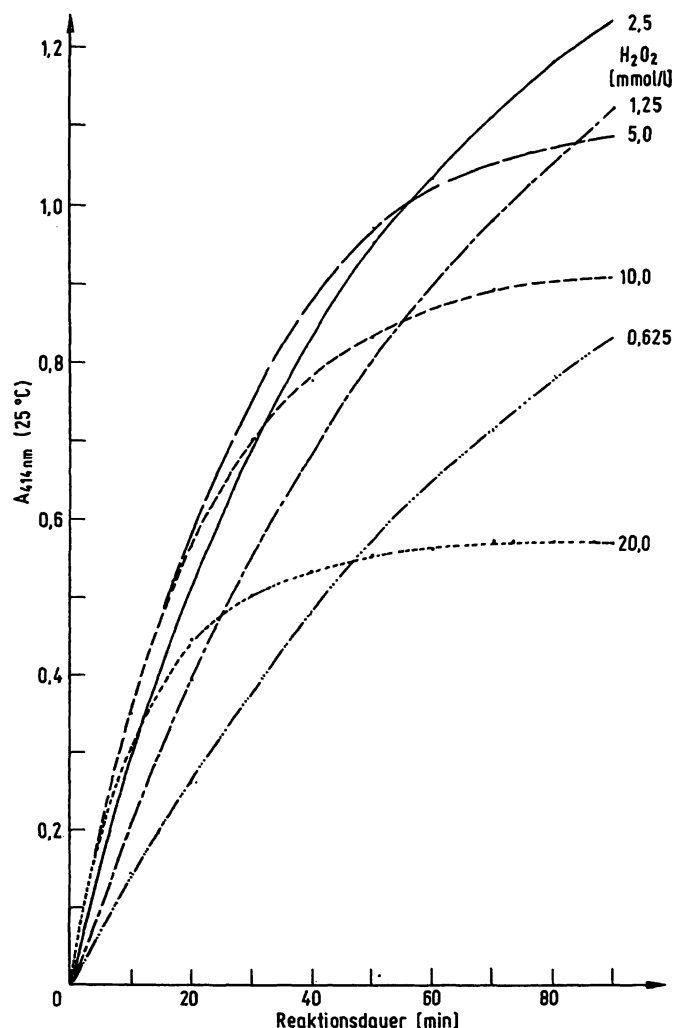


Abb. 8. Peroxidaseaktivität in Abhängigkeit zur  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration und zur Reaktionsdauer.

Bei einer Reaktionstemperatur von 25 °C werden 250 ng/l Peroxidase in 0,1 mol/l Natriumacetat vom pH 4,2 mit 0,05 mol/l Natriumdihydrogenphosphat, 2 mmol/l ABTS und verschiedenen  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen inkubiert und die Absorption bei der Wellenlänge 414 nm während 90 Minuten verfolgt.

Anfangsaktivität der Peroxidase mit 20 mmol/l  $\text{H}_2\text{O}_2$  gemessen. Bei einer Reaktionsdauer von 10 Minuten werden 10 mmol/l  $\text{H}_2\text{O}_2$ , bei einer solchen von 20 Minuten 5 mmol/l  $\text{H}_2\text{O}_2$  und bei einer Reaktionsdauer über 60 Minuten 2,5 mmol/l  $\text{H}_2\text{O}_2$  eingesetzt, um unter sonst identischen Bedingungen die höchste Farbintensität zu erreichen. Diese Verhältnisse sind damit zu erklären, daß mit zunehmender  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration in der Testlösung die Peroxidase entsprechend schneller inaktiviert wird. Diese Inaktivierung wird nur durch das  $\text{H}_2\text{O}_2$  verursacht und kann durch die Anwesenheit auch größerer Konzentrationen von ABTS nicht verhindert noch verringert werden. ABTS bietet der Peroxidase keinen Schutz vor der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Inaktivierung, obwohl es zusammen mit dem  $\text{H}_2\text{O}_2$  komplex ans aktive Zentrum des Enzyms gebunden wird.

#### Einfluß von Serum-Protein auf die Peroxidaseaktivität

Da bei der vorgeschlagenen Peroxidase-Testmethode bei einem pH-Wert von 4,2 gearbeitet wird, ist zu erwarten, daß die Serum-Proteine in einer größeren Konzentration ausfallen. Diese Testmethode ist nicht vorgesehen und auch nicht geeignet, die Peroxidaseaktivität im Serum zu bestimmen. Dazu müßte die Testlösung dahingehend abgeändert werden, daß die Serumprobe in 0,1 mol/l Natriumacetat vom pH 5,0 mit 0,05 mol/l Natriumdihydrogenphosphat, 10 mmol/l ABTS und 1,25 mmol/l  $\text{H}_2\text{O}_2$  bei 25 °C inkubiert wird.

Serum-Protein, das bis zu einer Konzentration von 100 mg/l in der Peroxidase-Testlösung vom pH 4,2 löslich ist, vermindert die meßbare Peroxidase-Aktivität (Tab. 2). Dabei tritt das Protein als Wasserstoffdonator in Konkurrenz zum ABTS, wodurch weniger ABTS-Radikalkation gebildet wird. Dies führt zu einer entsprechend geringeren Farbentwicklung.

Tab. 2. Einfluß von Serumprotein auf die Aktivität der Peroxidase  
Bei Anwesenheit verschiedener Serumproteinmengen in der Testlösung wurde die katalytische Wirkung von 500 ng/l Peroxidase in 0,1 mol/l Natriumacetat vom pH 4,2 mit 0,05 mol/l Natriumdihydrogenphosphat, 2 mmol/l ABTS und 2,5 mmol/l  $\text{H}_2\text{O}_2$  bestimmt, indem bei der Reaktionstemperatur von 25 °C die Absorptionsdifferenz während den ersten 10 Minuten bei der Wellenlänge 414 nm gemessen wurde. Durch Zusatz einer entsprechenden Menge Humanserum wurde die gewünschte Serumproteinkonzentration erreicht.

Serumprotein in der Testlösung (mg/l)	Peroxidase-Aktivität ( $\Delta A_{414\text{nm}}/\text{min}$ ) (25 °C)	Peroxidase- Aktivität (%)
0	0,0580	100
12,5	0,0560	97
25,0	0,0530	91
50,0	0,0520	90
100,0	0,0500	86

Da bei den enzym-immunologischen Bestimmungen sowohl die Peroxidase wie auch die übrige Proteinkonzentration (Antigen oder Antikörper) bei der enzymatischen Indikatorreaktion äußerst klein ist, kann die aufgezeigte Proteininterferenz bei diesen Peroxidase-Aktivitätsbestimmungen vernachlässigt werden.

#### Empfindlichkeit der beschriebenen Methode zur Bestimmung der Peroxidaseaktivität

Die Abbildung 9 zeigt die lineare Proportionalität der Peroxidasekonzentration zur gemessenen Absorptionsdifferenz pro Zeiteinheit. Die Nachweisgrenze liegt bei 10 ng/l Peroxidase. Andererseits könnte der Konzentrationsbereich wesentlich über die 250 ng/l erweitert werden bei entsprechend verkürzten Reaktionszeiten. Da bei den enzym-immunologischen Bestimmungen mit Standards gearbeitet wird, kommt der Berechnung der Peroxidasekonzentration aus der gemessenen Absorptionsdifferenz pro Zeiteinheit nur untergeordnete Bedeutung zu. Diese könnte mit Hilfe einer Peroxidase-Standardkurve (Abb. 9) oder bei einer genau definierten Bestimmungsmethode faktoriell über den molaren Absorptionskoeffizienten des ABTS-Radikalkations erfolgen.

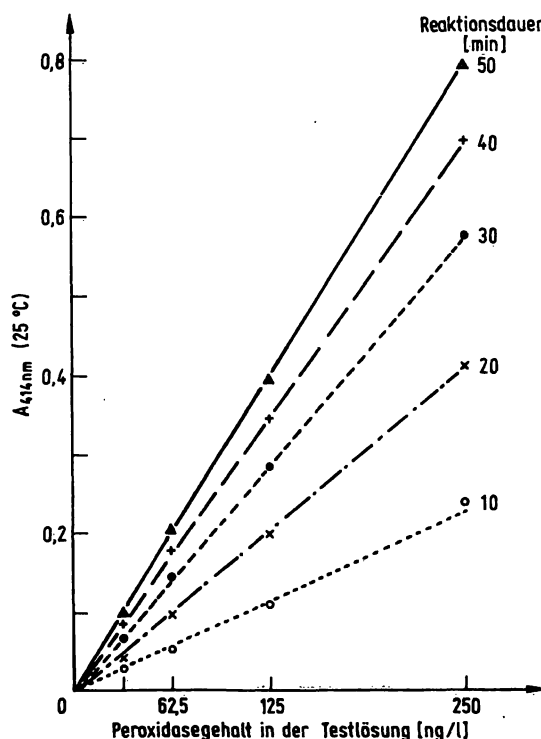


Abb. 9. Abhängigkeit der Absorptionsdifferenz von der Peroxidasekonzentration und der Reaktionsdauer.

Die angegebenen Peroxidasekonzentrationen werden in 0,1 mol/l Natriumacetat vom pH 4,2 mit 0,05 mol/l Natriumdihydrogenphosphat, 2 mmol/l ABTS und 2,5 mmol/l  $\text{H}_2\text{O}_2$  während 50 Minuten bei einer Reaktionstemperatur von 25 °C inkubiert und dabei laufend die Absorptionszunahme bei der Wellenlänge 414 nm gemessen.

## Literatur

1. Hünig, S. (1964), *Ann. Chem.* 676, 32–35.
2. Hünig, S., Balli, H., Conrad, H. & Schott, A. (1964), *Ann. Chem.* 676, 36–51.
3. Hünig, S., Balli, H., Conrad, H. & Schott, A. (1964), *Ann. Chem.* 676, 52–65.
4. Lang, H., Hönel, H. & Hahn, H. (1964), *Z. Anal. Chem.* 207, 321–325.
5. Gawehn, K., Wielinger H. & Werner, W. (1970), *Z. Anal. Chem.* 252, 222–224.
6. Werner, W., Rey, H.-G. & Wielinger, H. (1970), *Z. Anal. Chem.* 252, 224–228.
7. Kahle, K., Weiss, L., Klarwein, M. & Wieland, O. (1970), *Z. Anal. Chem.* 252, 228–231.
8. Eberhardt, D., Decker, S. & Klingmüller, V. (1971), *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.* 9, 362–363.
9. Susić, D. & Scheibe, P. (1971), *Z. Anal. Chem.* 257, 130–132.
10. Schreiber, J. & Lachenicht, R. (1973), *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.* 11, 31–34.
11. Szasz, G., Huth, K. & Busch, E. (1974), *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.* 12, 256.
12. Uete, T., Hori, T. & Fukutani, C. (1976), *Clin. Chim. Acta* 70, 329–332.
13. Majkić, N. & Berkes, I. (1977), *Clin. Chim. Acta* 80, 121–131.
14. Yamazaki, I. & Yokota, K. (1973), *Molecular Cellular Biochem.* 2, 39–52.
15. Welinder, K. G. (1976), *FEBS Letters* 72, 19–23.
16. Childs, R. E. & Bardsley, W. G. (1975), *Biochem. J.* 145, 93–103.
17. Shindler, J. S. & Bardsley, W. G. (1975), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 67, 1307–1312.
18. Shindler, J. S., Childs, R. E. & Bardsley, W. G. (1976), *Eur. J. Biochem.* 65, 325–331.
19. Dixon, M. (1953), *Biochem. J.* 55, 161–170.
20. Fridovich, I. (1963), *J. Biol. Chem.* 238, 3921–3927.

Dr. H. Gallati  
Diag. Forschungsabteilung  
F. Hoffmann-La Roche & Co.  
Grenzacherstr. 124  
CH-4002 Basel

